

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-512108

(43) 公表日 平成9年(1997)12月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/543	5 0 1	0276-2J	G 0 1 N 33/543 5 0 1 B
B 0 1 J 20/26		9538-4D	B 0 1 J 20/26 H
39/06		9538-4D	39/06
41/06		9538-4D	41/06
G 0 1 N 33/531		0276-2J	G 0 1 N 33/531 Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)			

(21) 出願番号 特願平7-528192
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)2月17日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)10月24日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 5 / 0 2 0 0 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 2 9 7 5 4
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)11月9日
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 2 3 4 , 6 5 4
 (32) 優先日 1994年4月28日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), J P

(71) 出願人 ミネソタ マイニング アンド マニュファクチャリング カンパニー
 アメリカ合衆国, ミネソタ, 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427, スリーエム センター (番地なし)
 (72) 発明者 グリーソン, レイモンド エム.
 アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427 (番地なし)
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 保持体に結合したリガンドの密度を調節する方法およびこれによって生成される生成物

(57) 【要約】

保持体上の活性化部位への低分子量リガンドの結合をクエンチャの競合により調節する方法が開示されている。この方法によって生成される誘導保持体は、過密結合部位や立体配置作用のない最適なリゲート結合を有する。アズラクトン官能性保持体、特に多孔性粒子などの多孔性保持体は、リガンド密度を調節することによる恩恵を被る。リガンドおよびクエンチャのモル比と結合されたリガンドの密度との間には線形的な関係がなりたつ。任意に、使用するリガンドに対してクエンチャを適宜選択することで誘導保持体の親水性を決定することができる。

【特許請求の範囲】

1. 活性化部位に対するリガンドのクエンチャとの競合を促進するのに十分な条件下でリガンドおよびクエンチャを保持体の活性化部位とを反応させ、リガンドが約1000原子質量単位未満の分子量を有する分子であり、かつ、リガンドの濃度とクエンチャの濃度が2桁の範囲内にある工程を含む、保持体に結合されるリガンドの密度を調節する方法。

2. 請求の範囲第1項の方法に記載のクエンチャおよびリガンドと共有結合反応した活性化部位を有する保持体を備える誘導保持体であって、保持体に結合形成したリガンドの密度は当初の活性化部位の約10%から約99%の範囲である誘導保持体。

3. クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と、保持体に結合したリガンドの密度とは線形的な関係にある請求の範囲第1項記載の方法あるいは請求の範囲第2項記載の保持体。

4. クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と、保持体のクロマトグラフィ性能とは線形的な関係にある請求の範囲第1, 3項記載の方法あるいは請求の範囲の第2～3項記載の保持体。

5. 反応のpHは約3から約12の範囲であり、リガンドのpKから4pH単位以内にある請求の範囲第1, 3および4項記載の方法。

6. クエンチャの濃度は0.01Mから10Mの範囲であり、保持体はリガンドおよびクエンチャと直接共有結合反応する請求の範囲第1および3～5項に記載の方法。

7. 保持体はアズラクトン官能性であり、保持体は多孔性である請求の範囲第1および3～6項に記載の方法あるいは請求の範囲第2～3項に記載の保持体。

8. 多孔性保持体は多孔性粒子である請求の範囲第7項記載の方法あるいは請求項7記載の保持体。

9. リガンドは、アミン含有化合物、チオール含有化合物、あるいはアルコール含有化合物を含み、クエンチャは保持体のアズラクトンとの共有結合反応についてリガンドと競合する化合物を含み、クエンチャは保持体の親水性を決定する

よう選択される請求の範囲第7および8項に記載の方法あるいは請求の範囲第7および8項に記載の保持体。

10. リガンドはアミン含有化合物であり、クエンチャはアミン含有化合物である請求の範囲第9項に記載の方法あるいは請求の範囲第9項記載の保持体。

【発明の詳細な説明】

保持体に結合したリガンドの密度を調節する方法およびこれによって生成される生成物

技術分野

本発明は、保持体に共有結合したリガンドの密度を調節する方法と、このような方法によって生成される生成物とに関する。

発明の背景

ポリマー保持体の修飾（誘導）は、様々の種類の診断用媒質やクロマトグラフィ用媒質を調製する上で主に用いられている方法である。保持体へのリガンドの結合すなわち特異分子や官能基の共有結合は、目的の分子の分離、同定および／または精製などを行う機能を保持体に付与するために必要である。ポリマー保持体上のリガンドの濃度すなわち密度を調節するための従来の技術は、概して以下の4つのカテゴリーあるいはこれらの組み合わせに分けられる。

a) マトリックスを「活性化する」反応条件、すなわちリガンドに結合し得る反応性基を導入する反応条件の操作。この方法では、「活性化試薬」の濃度、反応時間、反応温度、pH、あるいはこれらの変数のいくつかを変更することが多い。

b) 保持体へのリガンドの結合時における反応条件の操作。この方法では、保持体を修飾しようとするリガンドの濃度および／または総量を、上述した時間、温度、pHなどの変数だけでなく結合緩衝液のイオン強度や結合緩衝液中の塩の種類などと共に変化させる場合がある。

c) ポリマー保持体の形成時すなわち重合時にポリマー組成を

変化させることでポリマー保持体に導入される反応性すなわち「活性化可能な」官能基の量の操作。

d) 重合可能なリガンドモノマーを調製し、重合時にモノマー原料中の上記モノマーの濃度を変化させることでポリマーに導入されるリガンドの量の操作。

多くの場合、ポリマー保持体上のリガンド濃度を調節するための上述した技術を実用的かつ再現可能な方法で実施するのは極めて困難である。その主な理由は

、同時に調節しなければならない変数の数が多いことにある。これは、反応効率（すなわち、競争副反応に対する所望の反応の程度）が反応条件に大きく影響される最初の2つの技術では特にそうである。技術「c」ではある程度の調節を行うことができるように思われるが、結局次の工程でリガンドを結合するために「a」および／または「b」の技術を適用しなければならない。技術「d」では、リガンド密度を正確に調節できるように思われるが、診断用あるいはクロマトグラフィによる分離用として有用な多くのリガンドは、所望のポリマーの形成に必要な条件には適合しない官能基（例えば、企図した重合条件下では不安定であるか、あるいは重合を抑制するなどの形で重合反応を妨害するなど）を含有しているということが分かる。

リガンド結合が成功するか否かは2つの要因にかかっている。固定量および固定化の質である。保持体単位量あたりのリガンドの重量として表される固定量は、固定化の質に関係なく、結合したリガンドの量を示す指標となる。固定化の質は、保持体に結合したリガンドの量と、そのリガンドのクロマトグラフィ活性あるいは診断活性の有用性を保てるようリゲートとの結合相互作用を維持する機能との関係を示す指標となる。この活性を最適化することは好ましく、所望の用途に応じて固定化の量および質のいずれか一方あるいは

は両方を操作することによって達成できる。しかしながら、実用に供するには十分なリガンド密度でなければならない。

保持体は最大リガンド密度で結合することができるが、クロマトグラフィを行っている間のそのリガンドに対するリゲートの結合は、保持体に対するリガンドの多重部位結合（特に高分子量のリガンドに関して）や、隣接するリガンド同士の近位性による立体障害などの様々な要因によって抑制あるいは変化されることがある。このため、保持体に対するリガンド結合の密度が高すぎるとリガンドを無駄にすることになる上、特に、親和性クロマトグラフィや親和性診断などの用途では結合活性の面でも不要あるいは悪影響を及ぼすものとなる。これらの例において、リガンド結合における最適な条件は、リガンドと結合するリゲートに関してクロマトグラフィ活性あるいは診断活性を最大限に維持した状態で、結合し

たりリガンドの最大限に可能な密度を達成することである。このようにすることで、リゲート結合すなわち保持体上の結合リガンドの官能性が最適なものとなる。

疎水性相互作用クロマトグラフィや逆相クロマトグラフィ、カイラルクロマトグラフィあるいはイオン交換クロマトグラフィなどのクロマトグラフィ分離に関して見ると、固定化量が多いと結合相互作用が強くなりすぎ、溶出が困難になったり分離度が落ちたりする。このような場合、リガンド密度を低くしたりその分布を変化させたりする機能によって、選択性、分離度、リゲートの回収に関してクロマトグラフィの性能を改善できる。

多くのリガンド候補は、生物学的活性を保持するのに必要な特異的立体配座を有するタンパク質や酵素などの大きな分子である。近年、これらの高分子リガンドの結合に関して従来技術における制限をなくすための試みがなされている。抗原と抗体との結合を例にと

ると、抗体の表面密度の相互作用、多孔性保持体に対する抗体の多点付着、共有付着結合によって生じる不所望の制限立体配座などが原因で、抗原結合効率 は低くなる。Velandar et al. 著「The Use of Fab-Masking Antigens to Enhance the Activity of Immobilized Antibodies」、Biotechnology and Bioengineering 第39巻、1013～1023頁（1992年）を参照のこと。同文献には、保持体上に抗体を共有固定する前に合成抗原を使用してモノクローナル抗体のFab部分をマスクしておいてアンマスキングを行って、機能的効率がいかに高められたかを開示している。

米国特許第5,200,471号(Coleman et al.)には、ポリアニオン塩および緩衝水溶液の存在下での生体分子のアズラクトン官能ポリマー保持体への共有結合固定方法が記載されている。好ましいことに、この固定化は、アズラクトンクエンチャ、すなわち共有結合を形成する相手であるアズラクトン基に対してタンパク質リガンドと競合する他の分子の存在下でも起こる。この方法で生体分子の濃度よりも4～6桁高い濃度でクエンチャを併用すると、結合したタンパク質リガンドの密度を調節することにいくらか効果があるように思われる。しかしながら、その主な効果がリガンドの特異的な生物学的結合活性の改善にあることは明らかで

ある。

リガンド密度および／または生体分子の分布を調節するための他の試みは、PCT国際公開WO94/22918号および当該明細書中に引用されている引例に記載されている。

全く別の方法を使用して、米国特許第4,969,742号（Lewis et al.）は、リガンド結合のための活性部位の数を調節することでリガンド密度を調節する、二工程にわたる方法を教示している。この複雑な方法の第一工程では、非活性化ポリマー物質と予め定められた比率の過剰な量の「活性化」剤および「阻止」剤とを反応させる。

第二工程では、結合部位に対して競合する他の試剤を使用せずにリガンドを「活性化」剤の官能基と共有結合させる。この方法でもリガンド密度をある程度は調節できるが、それでもまだ制限はある。特に、この方法は「活性化」剤の導入についてのみ調節を可能にしてはいるが、この後のリガンドの結合には上述したような欠点を伴う。

発明の開示

保持体上のリガンド密度の調節は、低分子量のリガンドについて考えると複雑な多工程にわたる方法を使用しない限りは従来技術では十分に解決されていない課題の一つである。こうした従来技術における欠点は本発明によって解決される。

本発明では、単一の工程で適当なクエンチャの存在下でリガンドを共有結合させる。

この方法によれば、混合物中のクエンチャに対するリガンドのモル比が基本的に保持体に結合されるべき所望の比率であるリガンドとクエンチャの混合物をポリマー保持体と反応させて、リガンド密度の調節に伴う問題を解決する。

この方法を用いることで、結合対象となるリガンドの量に対するクエンチャの過剰使用を避けることができ、米国特許第5,200,471号において必要とされているようなポリアニオン塩を高濃度で含有する緩衝水溶液中で結合させる必要性をなくすることができる。

本発明の方法は、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互反応クロマトグラフィや逆相クロマトグラフィ、カイラルクロマトグラフィおよび親和性クロマトグラフィ用の保持体を調製する目的で分子の小さなリガンド（すなわち、原子質量単位が約1000未満の低分子量リガンド）を結合させる際に特に有利である。

結合用として好ましい保持体は、アズラクトン官能性の保持体である。

好ましいリガンドおよびクエンチャは、第一アミンおよび第二アミン官能性分子を含む。

本発明の方法によって生成される生成物は、保持体に結合させるリガンドの余計な使用を最低限に抑えつつ低分子量リガンドのリガンド密度を最適なリゲート結合用に調節できるという点で有利である。

本発明の特徴は、保持体へのリガンドの共有結合のための比較的制約のない反応条件である。すなわち、結合反応結果に有意に影響することなく、濃度、時間、温度などの反応条件を比較的広範囲に設定することができる。

本発明の他の特徴は、保持体上の反応部位を活性化あるいは不活性化する工程を必要とせずにリガンド密度を調節する機能である。

本発明の利点は、保持体上のリガンド密度を単一工程の結合反応で操作できるという容易さである。これは、リゲート結合および溶出を最適化することでクロマトグラフィ分離を最適化する上では有効な手段となり得るものである。

本発明について説明するにあたり、

「リガンド」とは、保持体上に共有結合固定される分子あるいは種を意味し、イオン型、疎水型、水素結合型などの相互作用によって溶液（リゲート）中の他の種と相互作用する一つ以上の官能基を含む。

「リゲート」とは、固定されたリガンドを含む保持体と可逆的に相互作用可能な分子あるいは種を意味する。

「結合（coupling）」とは、化学的共有結合によって、リガンドを保持体に固定することを意味する。これは、一般に非可逆的な反

応である。

「結合(bonding)」とは、リゲートの結合したリガンドとの相互作用を意味する。これは、一般に溶液のpHやイオン強度などを変化させることで中断可能な可逆的な反応である。

「直接共有反応性」および同様の意味を有する用語は、保持体にリガンドを結合させるためにさらに反応を必要としない官能基を含有する保持体を意味する。

「密度」とは、保持体上のリガンド濃度を意味し、一般に、保持体単位重量あるいは単位容量あたりのリガンドの重量あるいはモル当量で表される。

「分離度(resolution)」とは、クロマトグラフラン中の隣接する2種類の溶出溶質(リゲート)の分離度を意味する。

「選択性(selectivity)」は、クロマトグラフラン中の溶質の分離を意味する別の用語であって、ここでは一連のリゲートについての全体的なクロマトグラフィプロファイル(保持時間、分離、溶出順序など)を示す語として使用される。

「回収」とは、最初に供給された原料において利用できる量に対する、クロマトグラフィのカラムから溶出可能な精製リゲートの量を意味する。

発明の実施例

保持体

本発明の使用において許容可能な保持体は、本発明の範囲内で様々に変えることができる。保持体は、所望の用途に応じて多孔性であっても非多孔性であってもよい。保持体は最終用途に応じて連続体でも非連続体でもよい。保持体の作製には様々な材料を使用でき、セラミック、ガラス、金属、あるいはポリマー材料やこれらの材

料の組み合わせから作製された保持体などが挙げられる。保持体は、所望の用途に応じて可撓性であっても非可撓性であってもよい。

好ましい保持体としては、粒子状あるいはビーズ状保持体、織布ウェブあるいは不織布ウェブ(繊維ウェブなど)、微孔質ファイバ、微孔質膜などの、ポリマー保持体が挙げられる。

織ウェブあるいは不織ウェブは表面の物理的形状が規則的であろうと不規則的

であろうと保持体として有用である。繊維ウェブは表面積が大きいために特に好ましく、不織繊維ウェブは製造しやすさ、材料コストの低さおよび繊維組織や繊維密度を様々に変えることができるという点で好ましい。例えば0.05~50マイクロメートルなどの様々な繊維径を利用することができる。ウェブ厚についても例えば0.2μmから100cmあるいはそれ以上など、用途に応じて様々に変えることができる。繊維ウェブは、従来技術において周知の方法か、あるいは従来技術において周知の方法を部分的に修正することで作製できる。

既存ポリマー保持体は、微細孔膜、繊維、中空繊維あるいは管など、いずれも従来技術において周知のものであればよい。

セラミック保持体、ガラス保持体および金属保持体は、いずれも従来技術において周知であって、市販されているか、あるいは周知の様々な技術を用いて作製することができる。

総じて、本発明において有用な保持体は、PCT公開WO93/25594号、WO93/06925号およびWO94/22918号に記載されている。

好ましくは、本発明において使用される保持体は多孔性保持体であって、クロマトグラフィ技術用に市販されているものを含む。この多孔性保持体は、多孔構造を有して水や水溶液に不溶である、天然あるいは合成、有機あるいは無機など、どのような多孔性固体であってもよい。好ましい多孔構造の固体は、少なくとも直径1.0

ナノメートル (nm) の孔を有し、細孔容積は0.1 cm³/gを超える。孔が大きければ大きいほど拡散に対する制約が少なくなるため、細孔径は少なくとも30 nmであると好ましい。細孔周囲の表面積が大きくなると電位容量が大きくなるため、細孔容積は少なくとも0.5 cm³/gであると好ましい。好ましい多孔性保持体として、粒子状あるいはビーズ状の保持体が挙げられる。

本発明の目的に有用なものとするために、保持体は反応性保持体でなければならない。すなわち、所望のリガンドとの結合に使用できる反応性官能基を含有しなければならない。この反応性官能基は、所望のリガンドと迅速かつ直接的に共有結合して誘導保持体を形成できるものであるべきである。本発明の目的に有

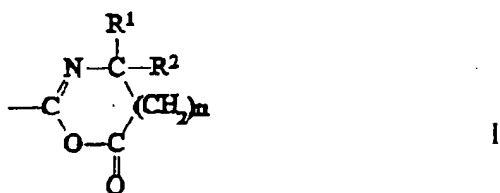
用な共有反応性官能基は、一般に求電子体として分類できる。求核基（例；アミン、アルコールあるいはメルカプタン）との反応の結果、付加反応あるいは置換型の反応（副生成分子が遊離される）によって共有化学結合が生成される。付加反応が好ましい。従来技術において周知の様々な「活性化方法」を使用して本発明の目的のために少なくともある程度は有用な反応性官能基を誘導することができるが、この方法には再生可能な結果を達成しにくいという上述したような問題がある。従って、反応官能性が再生可能なレベルで得られる保持体、特に市販の保持体を利用することが好ましい。

反応性官能基を含有する多数の有用な粒子や膜が市販されている。これらの有用な反応性官能基として、N-ヒドロキシサクシニミドエステル、スルホンエステル、ヨードアセチル基、アルデヒド、イミダゾリルカルバメートおよびシアノゲン臭化物活性化保持体などが挙げられる。

総じて、これらの反応性官能基はPCT公開WO94/22918号およびWO93/06925号に記載されている。

これらの官能基は、本願明細書に開示の方法に使用することもできるが、熱的不安定さや、所望の結合反応と拮抗し得る二次反応あるいは加水分解反応などの多くの問題を有するため、好ましいものではない。

本発明において有用な反応性保持体として特に好ましいのは、保持体の内面および／または外面にアズラクトン官能基を有する保持体である。このような反応性保持体は、以下の化学式Iで表されるアズラクトン官能基を有する。



ここで、R¹およびR²は独立に、炭素数1～14のアルキル基、炭素数3～14のシクロアルキル基、環原子数5～12のアリール基、炭素数6～26かつS、Nおよび非過酸化物のOへテロ原子数0～3のアレニル基（arenyl）であるか、あるいはR¹およびR²は共に炭素原子と結合して環原子数4～12の炭素環を形

成し、

n は0または1の整数である。

アズラクトン官能反応性保持体は、他の市販されている保持体反応性官能基よりもより良くかつ副反応（例；加水分解）をより少なくして迅速かつ直接的にリガンドと共有結合するため、本発明において特に好ましい。また、このようなアズラクトン官能基は、リガンドとの共有結合前には極めて安定である。さらに、リガンドとアズラクトン官能基との共有結合によって危険な副生成物分子の変位が

生じることはないため、リガンドの共有結合後の製品の純化（puvification）問題を最小限に抑えることができる。

また、アズラクトン官能保持体は、求核性リガンドに対する共有結合能が高いことで知られている。さらに、共有結合能が高いため、本発明によって広範囲にリガンド密度を調節する機能が得られる。このため、アズラクトン官能反応性粒子は本発明において使用するには特に好ましい。

アズラクトン官能性ポリマー粒子は、例えば、（メタ）アクリロイルアミノ酸と様々なフリーラジカル重合可能なモノマーとを共重合させた後、環化剤と反応させたり（米国特許第4,737,560号および第4,871,824号に開示されている）、あるいは米国特許第5,292,840号に開示されているようにアルケニルアズラクトンと他のモノマーとを共重合させるなどの方法で作製できる。

また、アズラクトン官能性粒子は、米国特許第5,292,840号に開示されているように、アズラクトン官能性ポリマー溶液を有機あるいは無機の粒子すなわち保持体に塗布しても作製できる。

また、アズラクトン官能性粒子は、欧州特許公開第0,565,978-A1号に開示されているように、脂肪酸水酸基をその表面に有する基体保持体へのグラフト重合によって生成することもできる。

アズラクトン官能性反応性粒子は、米国特許第5,013,795号および第5,262,484号に開示されているアズラクトングラフトコポリマーからも得られる。

アズラクトン官能性粒子の粒度は、約0.1～1000マイクロメートルであることができ、好ましくは0.5～250マイクロメートルである。乾燥アズラ

クトン官能性粒子の平均細孔径は約1～約300ナノメートルであればよく、好ましくは5～約200ナノメートルである。アズラクトン官能性粒子の平均細孔容積は、少なくとも

も $1.0 \text{ cm}^3/\text{g}$ (粒子)であることができる。粒度50～80マイクロメートルの粒子において、細孔容積が少なくとも $1.2 \text{ cm}^3/\text{g}$ であれば粒子容積の約60%が細孔容積となる。同じ粒子で、表面積は少なくとも $50 \text{ m}^2/\text{g}$ である。このため、本発明による共有結合固定化に利用できるアズラクトン官能粒子内に実質的な表面領域がある。

最も好ましくは、本発明に有用な多孔性保持体は、ミネソタ州St. PaulのMinnesota Mining and Manufacturing Companyから市販されているEmphaze™という銘柄の多孔性アズラクトン官能性活性化親和クロマトグラフィ用ビーズである。

その他のアズラクトン官能性保持体も本発明において有用である。PCT公開WO93/25594号公報に開示されている内容を利用して、繊維保持体や細孔膜などの既存の保持体をアズラクトン官能性にすることもできる。米国特許第5,292,514号(Capocchi et al.)に開示されている多官能性アズラクトン保持体も、本発明における保持体として有用である。また、PCT公開WO93/06925号公報において開示されているように、アズラクトン官能粒子を多孔性連続マトリックスに導入することもできる。

共有結合固定化用リガンド

上述したように、多孔性保持体上の反応性官能基は望ましくは求電子基である。このため、直接共有結合固定化について見れば、本発明において有用なリガンドは保持体の求電子基との結合用に求核基を含有する。リガンドの求核官能基の一例として、第一および第二アミン、アルコールおよびメルカプタンが挙げられる。これらのうち、アミン官能リガンドが特に好ましい。

誘導保持体の調製用として好ましいリガンドは、本発明の範囲内でも広範囲にわたる。リガンドとして効果を発揮するためには、そ

の分子は企図した最終用途において有用な他の官能基を1つ以上含有していなければならない。好ましくは、リガンドは誘導保持体の所望の用途に応じて選択される。最終用途には、クロマトグラフィ用保持体、診断試薬、金属イオンの錯化や除去としての用途などが挙げられる。例えば、カルボン酸やスルホン酸含有リガンドは、陽イオン交換用保持体の調製に有用であり、一方、アミン（第一アミン、第二アミンあるいは第三アミン）含有リガンドは、陰イオン交換用保持体の調製に有用である。芳香族基あるいは脂肪族基を含有しているリガンドは、疎水性相互作用クロマトグラフィまたは逆相クロマトグラフィ用の保持体の調製に有用である。生体分子に対して特異的な結合相互作用を示す官能基を含有しているリガンドは、親和性保持体や診断試薬の調製に有用である。

本発明の方法に基づいてリガンドを結合させれば、それらのリガンドは吸着、錯化、触媒作用、あるいは試薬としての最終用途などの生物学的あるいは化学的な相互作用に機能的効率を高めた状態で利用することができる。

誘導保持体は、吸着剤、錯化剤、触媒、試薬、クロマトグラフィ用物質として有用である。

本発明において有用なリガンドは、一般的には、分子量が低いすなわち約1000原子質量単位未満である。現段階で好ましいアズラクトン官能基は、アミン、チオールおよびアルコールによって求核攻撃される。このため、少なくとも1個のアミン、チオールあるいはアルコール基を有するリガンドが、アズラクトン官能性保持体上への共有結合固定化用の候補となる。共有結合（coupling）時に形成される連鎖（結合）の安定性を高めるという理由から、本発明の目的にはアミン官能リガンドが好ましい。このようなリガンド物質の一例として、アミノ酸、ジアミン、芳香族アミン、第一および

第二脂肪族アミン、ヒドラジンおよびヒドラジドなどのアミン含有化合物が挙げられる。

クエンチャ

クエンチャの種類は、保持体に結合されるリガンドの性質によって変わることができる。しかしながら、クエンチャは保持体上の同一の活性化部位に対してリ

ガンドと同様に反応性を有するものでなければならない。使用するクエンチャの量および種類は、保持体とリガンドとの間の反応速度（様々な要因のうち、pH、リガンド濃度、反応時間および温度に影響される）によって決まる。

好ましくは、クエンチャは、基本的に保持体に対する反応速度がリガンドと同一であろう。このため、リガンドに保持体への結合用の第一アミン求核基が含まれている場合には、クエンチャも第一アミン求核基を含有していると好ましい。この条件が成り立てば、基本的に、結合されるリガンドの密度は結合形成用溶液中のリガンドとクエンチャのモル比によって調節することができる。しかしながら、当業者間で周知のように、リガンドとクエンチャは保持体に対して完全に同一の反応速度を呈するわけではない。リガンドおよびクエンチャのいずれかにおける置換基が、それぞれの反応体の求核性に影響すると共に求核基周辺の立体化学的環境を変える。これらの作用はいずれも結合反応の全体としての速度に影響することができる。

特定の理論に限定されることはないが、クエンチャは多孔性保持体上のリガンドが結合し得る反応部位に対して競争反応する。反応部位の数を減らすことで、過密な結合部位を発生したり、そうでなければこのような部位に結合する生物学的に活性なリガンドの立体配座を変化させるような仕方でリガンドが結合する可能性を制限して、結合活性の減少あるいは喪失などが生じることが可能である。

意外なことに、クエンチャは結合用の反応部位を余分に除去することなく反応部位をまばらにすることで、リゲート結合を最適化すると考えられる。これによって、結合後のリガンドはより一層均一あるいは効果的に分布しやすくなる。

任意に、リガンド密度を調節するためだけではなく、結果として生じる誘導保持体マトリックスの親水性や疎水性に影響をおよぼすようにクエンチャを選択してもよい。極めて親水性の強いクエンチャ（例えばアンモニア）を使用すると、このようなクエンチャよりも疎水性の強いクエンチャ（例えばエタノールアミンやエチルアミンなど）を使用した場合よりも、結合後のリガンドの周囲により一層親水性の環境を形成することができる。親和性あるいは診断的な用途などで所望のリゲートに対するリガンドの特異的な相互作用を最大限にしたいような場合

には、上述したような結果が重要なこともある。一方、疎水性の強いクエンチャを使用することで、リゲートと周囲のマトリックスとの間の弱くて二次的な相互作用を促進することができる。このような作用は、クロマトグラフィでの選択性や分離度を調節する際には有用である。このように、リガンド密度と親水性／疎水性作用の両方を調節する能力は、クロマトグラフィの性能を最適化する上では極めて有効性の高いものである。

好ましいアズラクトン官能性多孔性保持体を使用する場合には、クエンチャはアズラクトンクエンチャである。適したアズラクトンクエンチャについては、米国特許第5,200,471号 (Coleman et al.) に開示されている。

使用できるアズラクトンクエンチャの一例として、エタノールアミン、ヒドロキシルアミン、メチルアミン、アニリン、エチルアミン、水酸化アンモニウム、硫酸アンモニウム、ブチルアミン、グリシンアミド、TRIS (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、

グリセリルアミン、グルコースアミン、アセトヒドラジドおよびこれらの組み合わせが挙げられる。

反応媒質中のアズラクトンクエンチャの濃度は、約0.01M～約10Mの範囲であればよい。望ましくは、この範囲は約0.05M～約2Mである。エタノールアミンをアズラクトンクエンチャとして使用する場合には、その濃度は約0.1M～約1Mの範囲でよい。現段階で好ましいアズラクトンクエンチャのエタノールアミン濃度は約0.1M～約0.5Mである。

共有結合固定化の競合方法

本発明の方法では、所望のリガンドとクエンチャが保持体上の同一の活性化部位に対して競合する単一工程を伴う。

所望のリガンドおよびクエンチャが競合する共有結合固定化のための反応条件は、非特定のであり、保持体上の同一の活性化部位に対するリガンドおよびクエンチャの競合に影響しない範囲で可変である。

反応溶媒は、水性、有機性、あるいは混合物でよいが、リガンドおよびクエンチャの両方を溶解あるいは十分に分散させて真に競合を達成できるようなもので

なければならない。この媒質は緩衝媒質であっても非緩衝媒質であってもよいが、クエンチャよりもリガンドに対して好都合であったり、その逆であったりしないようにすべきである。この媒質のポリアニオン塩濃度は高くても低くてもよい。これらの塩が存在しても通常は結合に影響はないためである。

反応温度は、好ましくは周囲温度であるが、約0℃から溶媒の沸点付近までの範囲で変化させることができる。反応圧力は周囲圧でよい。

反応媒質中のリガンドおよびクエンチャの濃度は同等でなければならない。すなわち、二桁(two orders of magnitude)以内、好ま

しくは一桁以内である。最も好ましくは、クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比は、約20:1から約1:20までの範囲である。さらに、リガンドとクエンチャの混合物(反応体)の濃度は、保持体上の反応性官能基の総量に対して当量ベースで過剰な濃度とする。官能基に対する反応体の当量比が約2:1でも満足できる結果が得られる場合もあるが、当量比が少なくとも10:1、好ましくは約20:1、最も好ましくは約100:1の時に最もよい結果が得られる。

反応溶液は通常は緩衝剤を必要とせず、特に求核基が第一あるいは第二アミンである場合にはそうであるが、必要に応じて緩衝剤を含有させてもよい。水溶液媒質用の緩衝剤としては、酢酸塩、リン酸塩、ピロリン酸塩、ホウ酸塩や、Good et al. 著、*Biochemistry* 5 (1966) 第467頁以降に開示されている緩衝剤のような当業者間で周知のその他の塩が挙げられる。

水性媒質中の緩衝剤の濃度は、結合用を選択したリガンドとクエンチャの濃度、および反応溶液のイオン強度やリガンドとクエンチャの溶解性に影響し得る他の任意の成分の濃度に応じて、約10 mM～約750 mMであることができ、好ましくは約50 mM以上約200 mM以下である。

競合的固定化の時間は、リガンドおよびクエンチャを完全に共有結合させられるだけの十分な長さとする。通常は約15～約240分で十分であるが、これよりも反応時間を長くすることも可能である。このように、共有結合固定化は競合するクエンチャが存在するにもかかわらず速やかに完了する。

結合形成条件は、反応溶液のpHを求核リガンドの1 pK_a 以内のpH、通常約3から約12の範囲のpHに変えることで改善される。pHをこの範囲にすることで、リガンドあるいはクエンチャに

おける求核基と保持体の表面上の求電子基との反応を最大限にする結合形成条件が得られる。しかしながら、結合形成を行うために選択する正確なpH範囲は、リガンドおよびクエンチャ上に存在する求核基の種類に応じて決められるであろう。こうして、第一または第二脂肪族アミン求核基が存在する場合には、使用するpH範囲を約9～約12、好ましくは約11～約12にする。芳香族アミンが存在する場合には、使用するpHは約3～約6、好ましくは約4～約5の範囲にする。また、芳香族アミンを使用する場合には、カルボジイミドなどの縮合剤を使用すると好ましい。これらの条件によって、リガンドおよびクエンチャは迅速かつ確実に保持体に結合形成する。

結合形成の速度は、結合形成の速度定数、リガンド濃度、リガンドおよびクエンチャの求核性、保持体単位面積あたりの官能基の反応性、pHおよび温度などの関数である。要するに、リガンドについての反応速度とクエンチャについての反応速度は分かっているべきであり、所望のリガンド密度あるいは親水性の値のために反応性の高いリガンドに競合するクエンチャを比較的非反応性にするあるいはその逆が必要である場合以外は、クエンチャよりもリガンドにとって好都合であったり、あるいは逆であったりすることのないようにすべきである。しかしながら、上述したように反応性官能基に対してリガンドとクエンチャの合計量が過剰になるようにする場合には、これらの他の反応変数は固定化反応の達成には比較的影響をおよぼさない。

以下の実施例において明らかなように、意外にも、現段階で好ましいアズラクトン保持体を使用すると、リガンドおよびクエンチャのモル比と結合されたリガンドの最終的な密度との間に概して線形の関係が得られるということが分かった。さらに、結合されたリガ

ンドの密度とタンパク質リゲートについてのクロマトグラフ能力との間にも概し

て線形の関係が観察される。これらの所見から、驚くべきことに、固定化時に拮抗副反応は認められず、リガンド密度が比較的高くても、結合したリガンドはすべてリゲートと相互作用するということが分かる。このように、この状況では、意外なことに、リガンドおよび／またはクエンチャと保持体との反応に関する詳細な速度論情報がない場合であっても、比較的簡単に最適な結合リガンド密度やリゲート容量を得るために必要なモル比を決定することができる。2、3の迅速なスクリーニング反応の実施（例えば、①クエンチャのない状態でリガンドの結合形成、②同等の濃度でリガンドおよびクエンチャの結合形成、③高濃度のクエンチャの存在下でリガンドの結合形成）、リガンド密度あるいはクロマトグラフィ性能のいずれかの評価、データのプロット、得られた線形関係を使用してリガンド密度を最適化することを簡単に行うことができる。この線形の関係はさらに、本発明の方法におけるアズラクトン官能保持体の使用にも影響する。

当業者らに明らかなように、上述した線形関係の勾配は、リガンド対クエンチャの相対的反応速度やリガンドとリゲートの相互作用の相対強度にある程度影響される。従って、各用途ごとに別途最適化を行うこともできる。換言すれば、特定の原料流から特定のタンパク質を最適にクロマトグラフィ精製する特定のリガンド密度（および、任意に親水性）は、タンパク質が異なったり原料が異なったりした場合に最適であるとは限らない。しかしながら、本発明の方法を使用すれば、多数の反応条件変数を厳密に調節する必要性はなくなるため、必要な最適化工程を大幅に簡略化することができる。

本発明の有用性

本発明の方法によれば、リゲート結合の利益なしでリガンドを結合する表面混雑を、最小限に抑えるような仕方で保持体上のリガンド密度を最適化する方法が提供される。あるいは、本発明の方法によれば、容易な溶出を可能にするには強すぎるリゲート結合を最小限に抑えるような仕方でリガンド密度を調節する方法が得られる。さらに、本発明の方法によれば、クロマトグラフィ性能を最適化するような仕方でリガンド密度を最適化する方法が得られる。誘導された保持体は、調節されたリガンド密度で、任意に修正された親水性や疎水性をもってリガ

ドと結合し、最適なリゲート結合や最適なクロマトグラフィの分離度、選択性、回収性が達成される。さらに、誘導された保持体を使用することで、従来技術においては知られていなかった、リゲート結合の選択性や所望のリゲートの回収性などについて、ある程度調節することができるようになる。

最適ナリガンド結合形成は、保持体の質量または容量あたりの結合形成したリガンドのモル濃度または質量濃度あるいは保持体単位面積あたりの結合形成リガンドのモル濃度または質量濃度による保持体上のリガンド密度を用いて表現することができる。一つの保持体について達成可能な最大リガンド密度は、保持体に最初から存在する反応性官能基の濃度によって決まる。リガンド密度は、最初の活性化部位の約10%から約99%の範囲であることができる。

アズラクトン官能保持体はリガンドと反応し、米国特許第5,292,840号に記載されている反応によってアダクト保持体を形成する。

本発明の範囲についての理解を深めるために、以下の実施例を挙げておく。

手 順

陽イオン交換容量： 15 ml のポリプロピレン製使い捨てクロマトグラフィカラムに誘導ビーズ保持体1 ml を充填した。このカ

ラムを、装填緩衝液10 ml、MPOS（4-モルホリンプロパンスルホン酸）／pH 7.5を10 mM使用して洗浄して平衡化し、タンパク質溶液（ミズーリ州セントルイスのSigma Chemical Co.から入手できる鶏卵白身のリゾチーム pI 11.0）10 ml を装填した。未結合のリゾチームをMOPS緩衝液30 ml（10 mlのフラクション3つ）で洗い流した。最後に、MOPS緩衝液に溶解した1 MのNaClを15 ml使用して結合タンパク質を溶出させた。Hewlett-Packard製のダイオードアレイ吸光分光計モデル8452Aを使用して280 nmでのUV吸光度を測定し、様々なフラクションで回収されたタンパク質を決定し、純粋なリゾチームを使用して得られた標準的な曲線と比較した。NaCl溶出液から回収されたタンパク質の量は、保持体の陽イオン交換容量と同等視できるものであった。

陰イオン交換容量： 使用した手順は、装填したタンパク質がウシ血清アルブ

ミン (B S A、Sigma Chemical Co.) であること以外は陽イオン交換容量について上述した手順と同様である。純粋なB S Aも使用して標準的な曲線を得た。

リガンド、クエンチャおよび緩衝液の調製： 特に明記しない限りは、全ての溶液は脱イオン水中において調製した。必要に応じて、1 0 M水酸化ナトリウムか、あるいは1 0 N塩酸を使用してp Hを適宜調節した。化学物質、緩衝塩などはいずれもウィスコンシン州ミルウォーキーのAldrich Chemical Co. かミズーリ州セントルイスのSigma Chemical Co. から購入した市販品である。

実施例 1 ～ 5

これらの実施例は、陽イオン交換クロマトグラフィに有用な、カルボキシル官能性ビーズの調製用のリガンド密度の調節について説

明するためのものである。以下の溶液を調製した。

溶液A (リガンド溶液) 1 Mアスパラギン酸 p H 9 . 0

溶液B (クエンチャ溶液) 3 Mエタノールアミン p H 9 . 0

次に、溶液A及びBの混合物を調製した。E m p h a z e 生体支持媒体A B 1 ビーズ (ミネソタ州サンパウロの3M Bioapplicationsから入手可能なアズラクトン官能ビーズであって、約4 0 ～ 4 5 マイクロモル / m l (保持体) のアズラクトン官能性を有する) 1 2 5 m l に各混合物5 m l を添加して攪拌し、これによって得られたスラリーを室温で2時間端から端まで攪拌しながら反応させ、濾過し、脱イオン水 (3 × 1 0 m l) および1 % H C l (1 0 m l) で洗浄し、最後に溶出物が中和p Hになるまで脱イオン水で洗浄した。リゾチームについて陽イオン交換容量を測定することで、上述した誘導の結果を検定した (表1)。

表 1 カルボキシル官能ビーズの調製

実施例	溶液A(ml)	溶液B(ml)	モル比	IEX 容量 (mg/ml)
1	0	1 0	0 : 1 0 0	5 . 1
2	5	5	2 5 : 7 5	2 1 . 5
3	6	2	5 0 : 5 0	3 1 . 3
4	9	1	7 5 : 2 5	3 8 . 5
5	1 0	0	1 0 0 : 0	4 8 . 7

イオン交換容量をクエンチャ（エタノールアミン）対リガンド（アスパルギン酸）のモル比に対してプロットすると、線形の関係が観察される。この関係を使用すれば、溶液AとBとの適当な混合物を生成するだけで上述した実施例とは異なるIEX容量の誘導ビーズを調製することができる。

実施例6～11

以下の実施例は、陰イオン交換クロマトグラフィに有用なアミン官能ビーズの調製時におけるリガンド密度の調節について説明するためのものである。以下の溶液を調製した。

溶液A（リガンド溶液） 0.5M 1, 6ヘキサンジアミン pH11.0

溶液B（クエンチャ溶液） 1.0Mアンモニア pH11.0

次に、溶液AとBとの混合物を調製（各20ml）し、室温で2時間EmphazeAB1ビーズ（1.00g、水和した場合に8mlに相当）と反応させ、溶出物が中和pHになるまで脱イオン水で洗浄した。固定化されたアミンリガンドの量を以下のようにして分析した。（Buechner漏斗、濾過フラスコ、ウォーターアスピレータのセットアップを使用して）脱イオン水300ml、0.1N HClを300ml、0.0001N HClを300mlで誘導ビーズを連続的に洗浄した。最後の洗浄後、液体の大部分が除去されて湿った濾過ケーキのみが残るまで真空を維持した。この濾過ケーキの残った濾過漏斗を清潔な250ml濾過フラスコに移し、10%（wt/wt）硫酸ナトリウムを50mlずつで2回洗浄してイオンの結合した塩化物イオンを置換させた。各洗浄時、ビーズを濾過前に1分間溶液中で懸濁させたまま放置した。これらの硫酸ナトリウム濾液混合物を5%（wt/wt）クロム酸カリウム1mlとを混合し、磁気攪拌機で強く攪拌し、0.2500Mの硝酸銀で薄い赤い endpoint まで滴定して、必要な滴定液の容積を記録した。非誘導ビーズ試料を使用して、ブランクの滴定容積を得た。試料の容積（滴定量）とブランクの容積（滴定量）との差を利用してアミン含有量をマイクロモル/ml（ビーズ保持体）で算出した。BSAを使用して陰イオン交換容量を判定した（表2）。

表 2 アミン官能ビーズの調製

実施例	溶液A(ml)	溶液B(ml)	アミン含有量	IEX 容量 (mg/ml)
6	4	16	18.8	11.7
7	8	12	25.6	20.8
8	10	10	29.6	24.4
9	12	8	29.0	25.4
10	16	4	34.4	28.2
11	20	0	41.5	32.5

陰イオン交換容量をアミン含有量に対してプロットすると、線形の相関関係が観察される。この相関関係を使用して、所望のリガンド密度（あるいはこれに対応するIEX容量）を有する誘導ビーズを生成するのに必要な反応条件を求めることができる。

実施例12～15

以下の溶液を調製した。

溶液A（リガンド溶液） 0.5Mエチレンジアミン

溶液B（クエンチャ溶液） 1.0Mアンモニア

溶液C（クエンチャ溶液） 1.0Mエタノールアミン

溶液Aと溶液BおよびCのいずれか一方との混合物を調製し、各反応にビーズ1.25g（水和した場合に10mlに相当）を使用した以外は実施例6～11と同様にEmpha ze AB1ビーズと反応させた。実施例6～11において使用したものと同様の滴定法によってアミン含有量（リガンド密度）を測定し、BASを使用して同様に陰イオン交換容量を測定した（表3）。

表 3 エチレンジアミン誘導ビーズ

実施例	溶液A(ml)	溶液(ml)	アミン含有量	IEX 容量 (mg/ml)
12	20	0	39.1	18.4
13	10	(B) 10	23.7	10.2
14	4	(B) 16	14.1	0.7
15	10	(C) 10	27.2	7.7

ここでも、上記の結果から対応するイオン交換容量の調節と伴にリガンド導入濃度が簡単に調節されたことが分かる。さらに、上記の結果から、クエンチャの選び方次第でリガンド密度および容量をさらに調節できることも分かる（クエンチャの同一性が表に示されたイオン交換容量に関してリガンドの効率を変化させるように思われる実施例13と15とを比較のこと）。

実施例16～19

以下のリガンド溶液を調製した。

溶液A 1. 0M 2-ジエチルアミノエチルアミン

実施例12～15におけるクエンチャ溶液BおよびCを使用し、上記のようにEmphaze AB1ビーズの誘導用の混合物を調製した（表4）。

表4 DEAE誘導ビーズ

実施例	溶液A(ml)	溶液(ml)	アミン含有量	IEX 容量 (mg/ml)
16a	20	0	30.2	15.4
16b	20	0	32.7	15.7
17	10	(B) 10	26.8	9.2
18	10	(C) 10	21.1	2.8
19	2	(C) 18	16.4	0.3

実施例20～22

これらの実施例は、芳香族アミン官能リガンドと結合している場

合のリガンド密度の調節について説明するためのものである。以下の溶液を調製した。

溶液A（リガンド溶液） 1. 0M 0.1M MES（4-モルホリンエタンスルホン酸）中の4-アミノベンズアミジン、pH4.0

溶液B（クエンチャ溶液） 0.1M MES中の1.0Mアニリン、pH4.0

溶液AおよびBの混合物を調製し、EDC（N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド）300mgの存在下で室温で一晩、Emphaze AB1ビーズ試料1.25gと反応させた。BSAについてのリガンド密度（

アミン含有量) および陰イオン交換容量の調整および評価を先の実施例と同様に行った(表5)。

表5 ベンジルアミン誘導ビーズ

実施例	溶液A(ml)	溶液B(ml)	アミン含有量	LEX 容量 (mg/ml)
20	20	0	36.8	35.8
21	10	10	26.8	9.3
22	4	16	3.3	0.8

これらの実施例は、結合形成されているリガンドが芳香族アミンであって、この例ではカルボジイミドである縮合剤を使用して結合形成を補助しなければならない場合のリガンド密度の調節について説明する。この技術を使用して、4-アミノペンザミジン、(トリプシンや同様の酵素の精製用の親和性リガンド)のリガンド密度を調節することもできる。

実施例23~28

これらの実施例は、ポリアニオン塩の低分子量リガンドを結合する上での相対的な非効率さについて説明するためのものである。以

下の溶液を調製した。

溶液A (リガンド溶液) 1.0M 2-ジエチルアミノエチルアミン (DEAE A)

溶液B (リガンド溶液) 1.0M 硫酸ナトリウム中の1.0M DEAE A

溶液C (リガンド溶液) 0.5M エチレンジアミン

溶液D (リガンド溶液) 1.0M 硫酸ナトリウム中の0.5M エチレンジアミン

溶液E (クエンチャ溶液) 1.0M エタノールアミン

溶液F (クエンチャ溶液) 1.0M 硫酸ナトリウム中の1.0M エタノールアミン

混合物を調製し、Emphaze AB1ビーズと反応させ、先の実施例と同様に評価した(表6)。

表 6 アミン誘導ビーズ ポリアニオン塩の影響

実施例	溶液 (ml)	溶液 (ml)	アミン含有量	LEX 容量 (mg/ml)
2 3	(A) 2 0	0	2 2 . 8	1 7 . 0
2 4	(B) 2 0	0	2 6 . 0	1 9 . 5
2 5	(A) 1 0	(E) 1 0	2 0 . 5	1 3 . 9
2 6	(B) 1 0	(F) 1 0	2 4 . 0	1 5 . 1
2 7	(C) 1 0	(E) 1 0	1 8 . 2	8 . 0
2 8	(D) 1 0	(F) 1 0	2 0 . 8	1 1 . 0

ポリアニオン塩すなわち硫酸ナトリウムの存在下あるいは非存在下での結合形成用に得られたリガンド含有量すなわち I E X 容量の差は、基本的にこの試験方法や同一の反応 (duplicate reactions) において観察される変化の範囲内である (例えば、実施例 1 6 a および 1 6 b を参照のこと)。

比較例 1 ~ 3

これらの実施例は、リガンドおよびクエンチャの p K 近辺で誘導反応を実施することの重要性について説明する。以下の溶液を調製した。

溶液 A (リガンド溶液) 0 . 5 M 1, 6 - ヘキサンジアミン、p H 7 . 5

溶液 B (リガンド溶液) 1 . 0 M 硫酸ナトリウム中の 0 . 5 M 1, 6 - ヘキサンジアミン、p H 7 . 5

溶液 C (クエンチャ溶液) 1 . 0 M エタノールアミン、p H 7 . 5

溶液 D (クエンチャ溶液) 1 . 0 M 硫酸ナトリウム中の 1 . 0 M エタノールアミン、p H 7 . 5

混合物を調製し、Emphaze AB1 ビーズと反応させ、先の実施例と同様に評価した (表 7)。

表 7 脂肪族リガンドの p H 7 . 5 での結合形成

実施例	溶液 (ml)	溶液 (ml)	アミン含有量
1	A (2 0)	0	1 4 . 5
2	A (1 0)	C (1 0)	1 1 . 6
3	B (1 0)	D (1 0)	8 . 7

これらの結果から、pH 7.5（この例ではリガンドのpKよりも約4 pH単位低い）での結合形成によって、おそらく加水分解などの競争副反応が原因で、結合リガンドの密度が大幅に低くなることが分かる。ここでも、ポリアニオン塩は促進作用を持たなかった。

実施例 29～30

これらの実施例は、疎水性相互作用クロマトグラフィ用のリガンド密度の調節について説明する。以下の溶液を調製した。

溶液A（リガンド溶液）：0.5M ベンジルアミン、pH 11

0

溶液B（クエンチャ溶液）：0.5M エタノールアミン、pH 11.0

溶液AとBとの混合物を調製し、先の実施例と同様にEmphazeビーズと反応させた。Waters Lambda Max UV吸光分光計およびMaximaデータ獲得ソフトウェアを備えたWaters Delta Prep 3000クロマトグラフを使用して、これらの試料を評価した。Waters AP-1カラムに床高1.3cm（総容積1.0ml）までビーズ試料を充填した。結合用緩衝液は、1.5M硫酸アンモニウムと、50mMリン酸ナトリウムとからなり、pH 7.1であった。溶出用緩衝液は、50mMリン酸ナトリウムとからなり、pH 7.1であった。試料タンパク質溶液は、濃度5mg/mlで結合用緩衝液に溶解させた鶏卵白身のリゾチームであった。試料タンパク質溶液5mlを1ml/分の速度でカラムに装填した。次に、結合用緩衝液を使用して1ml/分の速度でカラムを5分間洗浄し、続いて2ml/分の速度で10分間洗浄した。次に、この緩衝液を単一の工程にて溶出緩衝液と交換した。溶出した画分の光学濃度が基線に戻るまで結合タンパク質の溶出を吸光分光定量的にモニタリングした。20mlの溶液Aを使用して誘導された実施例29は、殆どすべての適用したタンパク質と結合し、溶出によって最大光学密度約0.7の急激な左右対称のピークの結合タンパク質が除去されることが分かった。溶液AとBとの50:50混合物を使用して誘導された実施例30では、画分の流れに大量の未結合タンパク質が認められる一方、結合タンパク質についての溶出ピークの最大光学密度は約0.35であった。

実施例31～33

これらの実施例は、オキシラン（エポキシ官能）ビーズの誘導時

におけるリガンド密度の調節の試みについて説明する。オキシランビーズを以下のようにして調製した。

機械的攪拌装置（攪拌速度450rpm）と、窒素ガス導入口と、温度計と、コンデンサとを備えた1リットルのクリーズを施した丸底フラスコに、トルエン（188ml）と、ポリ（イソオクチルアクリレート-コ-アクリロイルアミノイソブチルアミド）0.133gと、ヘプタン（348ml）と、グリシジルメタクリレート（0.72ml）とを仕込んだ。この混合物を攪拌し、窒素を導入しながら35℃まで加熱した。この攪拌混合物中に、メチレンビスアクリルアミド（13.3g）とイソプロパノール（90ml）と過硫酸ナトリウム（0.55g）と脱イオン水（60ml）との混合溶液を添加した。さらに5分間攪拌した後、テトラメチルエチレンジアミン（0.55ml）を添加して重合を開始した。全体で4時間重合を継続した後、これによって得られたビーズを濾過し、アセトンで3回洗浄し、真空下で一晩乾燥させて、保持体1ミリリットルあたりエポキシド官能基約40マイクロモルを含有するオキシランビーズを生成した。38～106篩カットから得られるビーズを誘導実験に使用した。

実施例23～28の溶液AおよびEを使用し、上述したオキシランビーズの試料1.0gを誘導した。先の実施例と同様に評価を実施した（表8）。

表8 オキシランビーズの誘導

実施例	溶液A(ml)	溶液E(ml)	アミン含有量	LEX 容量 (mg/ml)
31	20	0	39.1	26.7
32	10	10	33.6	25.4
33	4	16	32.3	22.9

これらの実験から、クエンチャに対するリガンドの比率が大幅に

変化しても、誘導されるビーズのリガンド濃度やクロマトグラフィ挙動には比較的影響はないということが分かる。

以上、実施例について例を挙げて説明してきたが、以下の請求の範囲およびこれと等価のものによって本発明の範囲を規定する。

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年3月12日

【補正内容】

請求の範囲

1. 活性化部位に対するリガンドのクエンチャとの競合を促進するのに十分な条件下でリガンドおよびクエンチャを保持体の活性化部位とを反応させ、リガンドが約1000原子質量単位未満の分子量を有する分子であり、かつ、リガンドの濃度とクエンチャの濃度が2桁の範囲内にあり、さらに、クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と保持体に結合したリガンドの密度とは線形的な関係にある工程を含む、保持体に結合されるリガンドの密度を調節する方法。

2. クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と、保持体のクロマトグラフィ性能とは線形的な関係にある請求の範囲第1項記載の方法。

3. 反応のpHは約3から約12の範囲であり、リガンドのpKから4pH単位以内にある請求の範囲第1～2項記載の方法。

4. クエンチャの濃度は0.01Mから10Mの範囲であり、保持体はリガンドおよびクエンチャと直接共有結合反応する請求の範囲第1～3項に記載の方法。

5. 保持体はアズラクトン官能性であり、保持体は多孔性である請求の範囲第1～4項に記載の方法。

6. 多孔性保持体は多孔性粒子である請求の範囲第5項記載の方法。

7. リガンドは、アミン含有化合物、チオール含有化合物、あるいはアルコール含有化合物を含み、クエンチャは保持体のアズラクトンとの共有結合反応についてリガンドと競合する化合物を含み、クエンチャは保持体の親水性を決定するよう選択される請求の範囲第5～6項に記載の方法。

8. リガンドはアミン含有化合物であり、クエンチャはアミン含有化合物である請求の範囲第7項記載の方法。

9. 請求の範囲第1～8項の方法に記載のクエンチャおよびリガンドと共有結合反応された活性化部位を有する保持体を備える誘導保持体であって、保持体に

結合形成したリガンドの密度は当初の活性化部位の約10%から約99%の範囲である誘導保持体。

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年5月22日

【補正内容】

請求の範囲

1. 保持体の活性化部位を、該保持体の当該活性化部位と競合するリガンドおよびクエンチャを反応させ、リガンドが約1000原子質量単位未満の分子量を有する分子であり、かつ、リガンドの濃度とクエンチャの濃度が2桁の範囲内にあり、さらに、クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と保持体に結合したリガンドの密度とは線形的な関係にある工程を含む、保持体に結合されるリガンドの密度を調節する方法。
2. クエンチャ濃度に対するリガンド濃度のモル比と、保持体のクロマトグラフィ性能とは線形的な関係にある請求の範囲第1項記載の方法。
3. 反応のpHは約3から約12の範囲であり、リガンドのpKから4pH単位以内にある請求の範囲第1～2項記載の方法。
4. クエンチャの濃度は0.01Mから10Mの範囲であり、保持体はリガンドおよびクエンチャと直接共有結合反応する請求の範囲第1～3項に記載の方法。
5. 保持体はアズラクトン官能性であり、保持体は多孔性である請求の範囲第1～4項に記載の方法。
6. 多孔性保持体は多孔性粒子である請求の範囲第5項記載の方法。
7. リガンドは、アミン含有化合物、チオール含有化合物、あるいはアルコール含有化合物を含み、クエンチャは保持体のアズラクトンとの共有結合反応についてリガンドと競合する化合物を含み、クエンチャは保持体の親水性を決定するよう選択される請求の範囲第5～6項に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT.

International Application No.
PCT/US 95/02005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 B01J20/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 212 905 (TSIBRIS) 15 July 1980 see column 4, line 52 - column 6, line 25 see column 12-13; example 2 ---	1-6
A	WO,A,79 00609 (NEW-YORK UNIVERSITY) 23 August 1979 see page 5, line 3 - page 9, line 34 ---	1
A	WO,A,79 00541 (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE) 9 August 1979 see page 10, line 1 - page 14, line 30 ---	1,2
A	US,A,4 582 875 (NGO) 15 April 1986 see column 3, line 14-66 see column 4, line 56 - column 5, line 15 ---	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document not published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 1995

Date of mailing of the international search report

14.06.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 qpo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wendling, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 95/02005

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 208, 1993 pages 16-25, WIRTH 'INFLUENCE OF LIGAND DENSITY ON THE PROPERTIES OF METAL-CHELATE AFFINITY SUPPORTS' see page 19, column 2, paragraph 4 ----	1
A	EP,A,0 437 912 (DOW CORNING) 24 July 1991 see page 3, line 19 - page 4, line 24 ----	1.2
A	WO,A,90 09238 (BIOPROCESSING) 23 August 1990 see page 3, line 22 - page 5, line 7 ----	1
A	EP,A,0 317 796 (MILES) 31 May 1989 cited in the application ----	
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 58, no. 8, 8 July 1986 pages 1607-1611, M.E. LANDGREBE 'PREPARATION OF CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS OF VARIABLE LIGAND DENSITY' -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(information on patent family members)

International Application No.
PCT/US 95/02005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4212905	15-07-80	US-A- 4162355	24-07-79
		DE-A- 2728214	12-01-78
		SE-B- 431877	05-03-84
		SE-A- 7707553	31-12-77
		US-A- 4260705	07-04-81
		US-A- 4213860	22-07-80
WO-A-7900609	23-08-79	US-A- 4229537	21-10-80
		CA-A- 1124190	25-05-82
		EP-A, B 0012751	09-07-80
WO-A-7900541	09-08-79	EP-A, B 0007917	06-02-80
		GB-A, B 2015552	12-09-79
		US-A- 4546161	08-10-85
US-A-4582875	15-04-86	AU-B- 581947	09-03-89
		AU-A- 5088185	12-06-86
		CA-A- 1239357	19-07-88
		EP-A, B 0184361	11-06-86
		JP-B- 7004240	25-01-95
		JP-A- 61173778	05-08-86
		JP-A- 6340707	13-12-94
		JP-A- 6340708	13-12-94
EP-A-437912	24-07-91	DE-D- 69004679	23-12-93
		DE-T- 69004679	26-05-94
WO-A-9009238	23-08-90	NONE	
EP-A-317796	31-05-89	US-A- 4968742	06-11-90
		AU-A- 2465788	01-06-89
		DE-A- 3875076	05-11-92
		JP-A- 1155272	19-06-89

Form PCT/ISA-210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(72)発明者 ラスムッセン ジェラルド ケー.
アメリカ合衆国, ミネソタ, 55133-3427,
セント ポール, ポスト オフィス ボッ
クス 33427 (番地なし)